



Title	遺伝子組換え体を用いたバイオオーグメンテーションによるトリクロロエチレンの分解に関する研究
Author(s)	石田, 浩昭
Citation	大阪大学, 2004, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/45996
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏 名	いし だ ひろ あき 石 田 浩 昭
博士の専攻分野の名称	博 士 (工 学)
学 位 記 番 号	第 1 8 9 9 1 号
学 位 授 与 年 月 日	平成 16 年 8 月 12 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第 4 条第 2 項該当
学 位 論 文 名	遺伝子組換え体を用いたバイオオーグメンテーションによるトリクロロエチレンの分解に関する研究
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 藤田 正憲 (副査) 教 授 大竹 久夫 教 授 那須 正夫 (薬学研究科) 助教授 池 道彦

論 文 内 容 の 要 旨

本論文は、フェノール資化菌 *Ralstonia* sp. KN1 が持つフェノールヒドロキシラーゼ (PH) によるトリクロロエチレン (TCE) 分解について検討し、その結果を基に、TCE 分解に必要な PH 遺伝子を構成的に発現させた遺伝子組換え体を開発して、TCE 汚染土壌・地下水の浄化を目的としたバイオオーグメンテーションの実用性を評価した研究をまとめたもので、序論、7 章からなる本論、結論及び総合討論から構成されている。

序論では、TCE による地下水汚染とその浄化の現状を概観し、遺伝子組換え体のバイオオーグメンテーションによる効率的な浄化の可能性とそのモニタリングの必要性を示し、本研究の目的を設定した。

第 1 章では、*Ralstonia* sp. KN1 の染色体上の PH 遺伝子上流部に、相同的組換えによって *tac* プロモーター (*P_{tac}*) を挿入し、PH 遺伝子が構成的に発現する組換え体 *Ralstonia* sp. KN1-10A を開発した。

第 2 章では、*Ralstonia* sp. KN1-10A の TCE 分解能、TCE 分解の代謝産物、及び中間生成物による分解阻害について検討した結果、本組換え体による TCE 分解では、有機塩素化合物などの有害な代謝産物がほとんど生成されないこと、ならびに中間生成物による著しい分解阻害が起きないことを明らかにした。

第 3 章では、*Ralstonia* sp. KN1-10A の染色体上にマーカー遺伝子としてルシフェラーゼ遺伝子を挿入することによって、混合微生物系中であってもコロニーの発光によって組換え体の特異的に検出できることを明らかにした。

第 4 章では、より高い TCE 分解能を持った組換え体を開発するために、*Ralstonia* sp. KN1-10A の PH 遺伝子の構成を詳細に調べ、TCE 分解活性を高めるために必要な *pheZ* が発現していないことを明らかにした。

第 5 章では、*pheZ* を含めた TCE 分解に必要な全遺伝子が構成的に発現するように遺伝子操作を施した *Ralstonia* sp. KN1-TACT 株を作製し、本株の TCE 分解速度、TCE 分解容量 (*T_c*) が、フェノールで誘導した野生株 *Ralstonia* sp. KN1 に比べて、それぞれ約 3 倍、約 4 倍と高い TCE 分解能を示すことを確認した。

第 6 章では、混合微生物系での組換え体の TCE 分解について検討し、組換え体の一部が原生動物によって捕食されるため、純粋培養系に比べて TCE 分解効率が低下することを明らかにした。また、模擬 TCE 汚染土を充填したカラム試験により、組換え体を用いたバイオオーグメンテーションの実用性を評価し、フェノールで誘導した野生株 *Ralstonia* sp. KN1 を用いたバイオオーグメンテーション及びフェノールのみを添加するバイオスティミュレーションよりも、高い TCE 分解効率が得られることを明らかにした。

第 7 章では、千葉県君津市久留里で実施された国内初のバイオオーグメンテーション実証試験において、地下水中

に添加したフェノール産生菌 *Ralstonia eutropha* KN-1 (野生株) を REP-PCR 法にてモニタリングし、本手法が混合微生物の中に存在する特定菌の検出に使用できることを明らかにした。

結論及び総合討論では、本研究で得られた成果を総括し、遺伝子組換え体のバイオオーグメンテーションが TCE 汚染浄化に有効であると結論するとともに、開放系での利用に関する今後の課題・展望を示した。

論文審査の結果の要旨

トリクロロエチレン (TCE) は世界で最も主要な地下水汚染物質の 1 つであり、その経済的かつ効率的な浄化には、バイオレメディエーションが有効であるといわれている。TCE の好氣的バイオレメディエーションでは、フェノール分解菌等による共代謝分解を利用するが、そのためにはフェノール等の誘導物質を添加する必要があり、実際の浄化事業を行う上では、工程管理や添加誘導物質による副次的汚染の問題を抱えることになる。本論文は、このような問題の解決とより効率的かつ安全な浄化技術の開発を目的として、誘導物質であるフェノールを添加することなく高い TCE 分解能を示し、容易にモニタリング可能な遺伝子組換え体を開発して、模擬 TCE 汚染土壌カラム実験によりその実用性を検討した研究の成果、ならびに千葉県君津市久留里で実施されたフェノール分解菌 (野生株) を用いた国内初のバイオオーグメンテーション実証試験の成果をとりまとめたものであり、その成果を要約すると以下になる。

(1) フェノールによる誘導なしに高い TCE 分解能を示す遺伝子組換え体 *Ralstonia* sp. KN1-TACT 株を作製し、その TCE 分解速度、分解容量が、野生株 *Ralstonia* sp. KN1 に比べてそれぞれ約 3 倍および約 4 倍と高いことを明らかにしている。

(2) 模擬 TCE 汚染土を充填したカラム試験により、組換え体を用いたバイオオーグメンテーションの実用性を評価し、フェノールで誘導した野生株 *Ralstonia* sp. KN1 を用いたバイオオーグメンテーション及びフェノールのみを添加するバイオスティミュレーションに比べて、高い TCE 分解効率が得られることを明らかにしている。一方、混合微生物系での組換え体の TCE 分解について検討し、組換え体の一部が原生動物によって捕食されるため、純粋培養系に比べて TCE 分解効率が低下することについても明らかにしている。

(3) 千葉県君津市久留里で実施された国内初のバイオオーグメンテーション実証試験において、TCE 浄化性能を評価するとともに、地下水中に添加したフェノール分解菌 *Ralstonia eutropha* KT-1 (野生株) を REP-PCR 法にてモニタリングし、本手法が混合微生物の中に存在する特定菌の検出に使用できることを明らかにしている。

以上のように、本論文は環境工学、特にバイオレメディエーション技術の発展に寄与するところが大きい。よって本論文は博士論文として価値あるものと認める。